



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

ARIADNE RAMALHO DE LIMA

MECANISMO DA MUTAÇÃO JAK2 V617F E SEU ENQUADRAMENTO
COMO CRITÉRIO DE DIAGNÓSTICO DAS PRINCIPAIS NEOPLASIAS
MIELOPROLIFERATIVAS Ph-

BRASÍLIA

2012

ARIADNE RAMALHO DE LIMA

MECANISMO DA MUTAÇÃO JAK2 V617F E SEU ENQUADRAMENTO
COMO CRITÉRIO DE DIAGNÓSTICO DAS PRINCIPAIS NEOPLASIAS
MIELOPROLIFERATIVAS Ph-

Trabalho de conclusão de curso,
apresentado no formato de artigo
científico ao UniCEUB como requisito
parcial para a conclusão do curso de
Bacharelado em Biomedicina.

Orientadora: Prof^a. Ms. Tatiana Karla dos
Santos Borges.

BRASÍLIA

2012

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ace	- Acetilação
AND	- DNA-binding domain
CIS	- Proteína cytokine-induzida SH2 dominante
COILED-COIL DOMAIN	- Espiral enrolada no domínio
EPO	- Eritropoietina
EPOR	- Receptor de Eritropoietina
FAB	- Franco-Americano-Britânico
FERM	- From 4.1 protein ezrin radixin moesin
GAS	- Gamma Activado Site
ISG-15	- ISGylation
LEC-NE	- Leucemia eosinofílica crônica não especificada
LMC	- Leucemia mieloide crônica
LMMC	- Leucemia mielomonocítica crônica
LNC	- Leucemia neutrofílica crônica
Met	- Metilação
MF	- Mielofibrose idiopática crônica
MO	- Medula óssea
OMS	- Organização Mundial da Saúde
Ph	- Cromossoma Philadelphia
Ph-	- Cromossoma Philadelphia negativo
PIAS	- Gu-binding protein, GBP
PTPs	- Proteínas tirosina fosfatases
PV	- Policitemia vera
RA	- Anemia refratária
RAEB	- Anemia refratária com excesso de blastos
RAEB-t	- Anemia refratária com excesso de blastos em transformação
RARS	- Anemia refratária com sideroblastos em anel
SAG	- Sequencias associadas ao interferon gama
SH2	- SRC homology 2
SMP	- Síndrome mieloproliferativa

SOCS-3

- Supressor of cytokine signaling-3

SP

- Sangue periférico

SUMO

- Sumoylation

TE

- Trombocitemia essencial

Mecanismo da mutação JAK2 V617F e seu enquadramento como critério de diagnóstico das principais neoplasias mieloproliferativas Ph-

ARIADNE RAMALHO DE LIMA^{*}; TATIANA KARLA DOS SANTOS BORGES^{**};

Resumo

A Síndrome Mieloproliferativa é uma doença hematopoética de origem clonal que apresenta amplificação de uma ou mais linhagens mieloides, sendo representada pelo conjunto de três doenças: Policitemia Vera, trombocitemia essencial, Mielofibrose, que compartilham aspectos clínicos e biológicos comuns. Quando relacionamos a fisiopatologia de algumas neoplasias mieloides envolvidas, percebemos a presença de tirosina kinases alteradas e proteínas fusionadas hiperativas resultantes de translocações, que exercem papel importante para a base genética das pesquisas relacionadas com a Síndrome Mieloproliferativa. A proteína JAK2, pertencente à família das *Janus kinases*, é também uma tirosina kinase fosforilada em resposta às ações de diversas citocinas, ativando assim diferentes vias de sinalização intracelular e participando do processo de transdução do sinal. Trata-se de uma mutação pontual: substituição de uma guanina por timina (G → T) no exon 14 do gene *JAK2*, levando à substituição de uma valina por fenilalanina (V → F) na posição 617 da proteína codificada (JAK2 V617F). Esta alteração é somática, sendo detectada em células de linhagem mieloide. Detectada em cerca de 95% de pacientes com Policitemia Vera, 50% em pacientes com Trombocitopenia essencial e 60% em pacientes com Mielofibrose. Percebe-se que mutação JAK2 V617F é a característica genética molecular importante para pacientes que tem diagnóstico confirmado de SMP.

Palavras-chave: Síndrome Mieloproliferativa, mutação JAK2 V617F, Via de sinalização, diagnóstico.

Ariadne Ramalho de Lima, Graduanda do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

Prof^a. Ms. Tatiana Karla dos Santos Borges, professora de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

Agradeço a **Deus** por sua fidelidade e cumprimento da sua promessa em minha vida. A compreensão, amor e apoio dos meus queridos pais e amigos, pelo constante incentivo e participação na minha história. Meu sincero agradecimento.

`` Porque desde a antiguidade não se ouviu nem com ouvidos se percebeu, nem com os olhos viu um Deus além de ti, que trabalha para aquele que nele espera`` Is 64.4

1 Introdução

A Síndrome Mieloproliferativa (SMP) compreende um grupo de condições que surge nas células tronco da medula óssea e se caracteriza pela proliferação clonal de um ou mais componentes hematopoiéticos. No Brasil, ainda não há um registro epidemiológico específico para as doenças mieloproliferativas individualizadas. A idade média ao diagnóstico é em torno dos 60 anos, sendo possível ocorrer dos 18-90 anos. (VAN DIJKEN, 1997; RANDI, 2004; HOFFBRAND et al., 2009).

Em 1976 o grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) sistematizou as diversas formas de Síndrome Mieloproliferativa. O modelo atual de 2008, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), propôs uma nova classificação para os distúrbios mieloproliferativos baseando-se nos seguintes critérios de diagnóstico: porcentagem de blastos em medula óssea (MO) e sangue periférico (SP), alterações citogenéticas e sideroblastos em anel. Passando a incluir como as doenças que compõem a SMP: a leucemia mieloide crônica (LMC), Policitemia Vera (PV), Mielofibrose idiopática crônica (MF), Trombocitemia essencial (TE), leucemia neutrofílica crônica (LNC), leucemia eosinofílica crônica não especificada (LEC-NE) (CASCIATO et al., 2008).

Entre as patologias que compõem a SMP a Leucemia Mielóide Crônica se destaca, pois, tem origem clonal decorrente da célula primordial da medula óssea “anômala”, que gera um aumento de células indiferenciadas que fazem parte da granulocitopoese. Tem como característica a translocação entre partes do cromossomo 9 e 22 (q12.3;q11.21) originando cromossomos atípicos 9q+ e 22q- denominado Philadelphia presente em cerca de 90% dos casos (LORENZI, 2003).

A presença do cromossomo Philadelphia determina o aparecimento de uma proteína que tem atividade de tirosina cinase tipo P210. A proteína quimérica (bcr-abl) interfere em atividades importantes no ciclo celular e apoptose, que são inibidas na LMC devido à expressão dos genes *BCR-ABL*, fazendo com que as células sobrevivam por um tempo maior que o normal, acumulando-se no sangue, na medula e em outros tecidos (LUCIA, 2008).

O grupo de três doenças que compõem a SMP Ph- a PV, TE e MF tem chamado a atenção de pesquisadores, pois não apresentavam nenhuma mutação que fosse característica e ajudasse no critério de diagnóstico, assim como o cromossoma Philadelphia na LMC. Então depois da descoberta da mutação JAK2

V617F descrita como uma única mutação no gene JAK2, recorrente em pacientes com SMPs clássicas e Bcr-Abl negativas, houve um avanço esplêndido para confirmação do diagnóstico. Hoje a mutação já faz parte dos critérios de diagnóstico para o grupo de SMPs Ph- (LIPKA, 2005).

A mutação JAK2 V617F exerce uma forte influência na proliferação clonal e diferenciação de característica celular devido alteração das enzimas JAKs responsáveis pela sinalização intracelular através da resposta a um estímulo de citocina no receptor junto com as STATs que levam informações para núcleo onde ocorreram processos de transcrição e tradução, eventos fundamentais para o desenvolvimento normal de uma célula (MONTE-MÓR et al., 2008).

O receptor EPO-R tem como ligante principal a eritropoietina (EPO) hormônio que promove a proliferação e diferenciação de células progenitoras eritróides e regula o número de eritrócitos no sangue periférico. Sua relação com as enzimas JAKs que sofrem a mutação é relevante visto tanto essas enzimas mutadas quanto as normais se acoplam aos receptores EPOR realizando processo de fosforização, o que desencadeia uma transdução de sinal intracelular exacerbada fazendo com que a célula tenha funções alteradas (D'ANDREA, 1989).

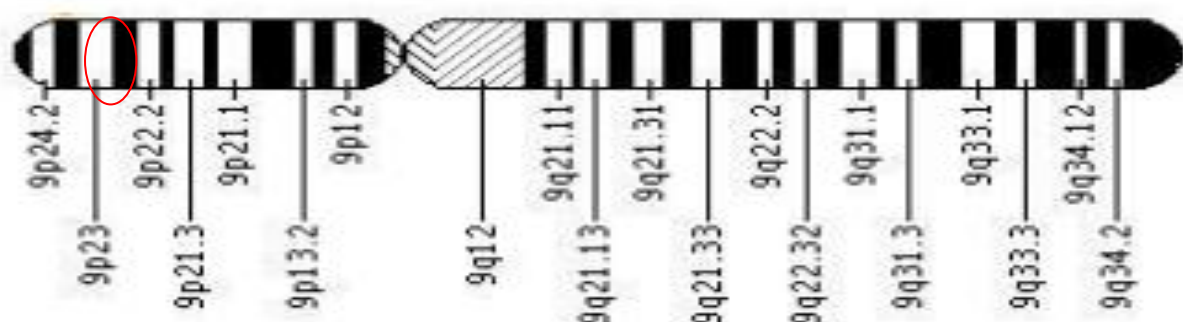
O presente artigo tem como objetivo fazer uma revisão bibliográfica sobre o mecanismo da mutação JAK2 V617F e seu enquadramento como critério de diagnóstico das principais doenças mieloproliferativas Ph- destacando o papel imunológico e genético.

2 Desenvolvimento

2.1 O gene JAK2

“JANUS KINASE 2”, é o nome oficial do gene JAK2 que possui localização citogenética no cromossomo 9p24 e localização molecular entre 4.985.244 e 5.128.182 pares de base. O gene comporta a função de produção das proteínas JAKs, que promovem o crescimento e divisão (proliferação) de células hematopoiéticas localizadas na medula óssea (MARTINO et al., 2008).

Figura 1 – Localização do gene JAK 2 no cromossoma 9



FONTE: Adaptado de Genetics Home Reference. Dez. 2011. Disponível em: <<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/JAK2>>. Acesso em: 12 nov. 2012.

O gene fornece instruções para a produção de uma proteína que promove o crescimento e proliferação celular. Esta proteína pertencente à família das Janus Kinases é também uma tirosina-cinase, fosforilada em resposta à ação de diversas citocinas, faz parte de uma via de sinalização designada via JAK/STAT que transmite sinais químicos do exterior da célula para o núcleo, a partir de múltiplos receptores hematopoiéticos de crescimento que sofrem estímulos de diversas citocinas e hormônios como a eritropoietina. É particularmente importante no controle da produção de células sanguíneas a partir de células tronco hematopoiéticas (SPIVAC, 2010).

A mutação JAK2 V617F não se encontra presente nas linhagens germinativas, porque é uma mutação adquirida como uma doença alélica somática no compartimento hematopoiético. Em 2006, François e colaboradores, realizaram um estudo em doentes com PV e MF. E demonstram que esta mutação ocorre num precursor hematopoiético de origem mielóide. Assim, o fenótipo da doença está provavelmente relacionado com a vantagem proliferativa dada essencialmente á serie mieloide, traduzindo-se numa doença mieloproliferativa e não numa doença linfoproliferativa (LEVINE et al., 2008).

2.2 Mutação JAK2 V617F

Entre março e abril de 2005, a mutação JAK2 V617F foi descrita durante o Terceiro Congresso Internacional sobre Síndromes Mieloproliferativas e Mielodisplásicas descrita como uma única mutação no gene JAK2, recorrente em

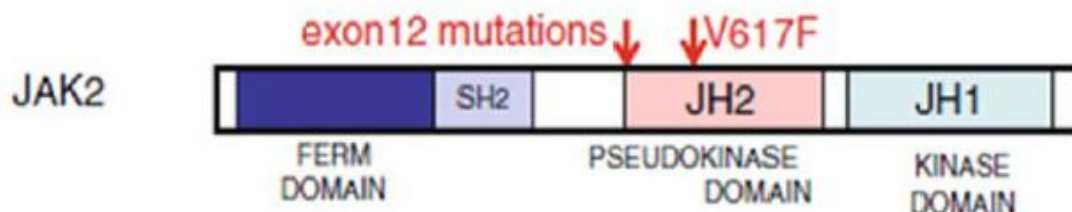
pacientes com SMPs clássicas e Bcr-Abl negativas. Foi considerado um avanço importante para a compreensão da base molecular das SMPs e principalmente a Policetemia Vera (SILVER et al., 2007).

É uma mutação pontual, com a substituição de uma guanina por timina (G -T) no éxon 12 do gene JAK2, levando à substituição de uma valina por fenilalanina (V - F) na posição 617 da proteína codificada (JAK2 V617F). Esta alteração é somática adquirida, sendo detectada em células de linhagem eritróide e mieloide (MONTE-MÓR et al., 2008, p. 02).

JAK2 é uma das enzimas que compõe o grupo de quatro tirosina-quinases (JAK), que por meio do seu domínio FERM, encontrado na parte N-terminal, se adapta intracelularmente aos receptores de citocinas, entre eles o receptor da eritropoietina (EPOR) e inicia uma transdução de sinal constante que leva a alteração dos processos de proliferação, diferenciação e morte celular por apoptose. Os domínios JH3–JH7, são essenciais para sua ligação com seguimentos proximais de membrana do domínio citosólico de EPOR (KRALOVICS, 2005).

Na figura a seguir pode-se observar a descrição dos domínios, JH2 (Pseudo-kinase dominante), responsável por regular o domínio JH1(Kinase-dominante) das enzimas JAKs, pois a mutação JAK2 V617F se encontra no sítio de JH2, isso faz com que as proteínas JAK passem a ter estímulos próprios de sinalização intracelular, sendo independente das citocinas se ligarem ao receptor celular. O que modifica o seu funcionamento celular afetando diretamente as atividades células, alteração dos processos de proliferação, diferenciação e morte celular por (VAINCHENKER et al.,2012).

Figura 2 – Localização da mutação JAK 2 V671F



FONTE: Adaptado de Delhomeau e colaboradores (2010).

A alteração do domínio JH2, na proteína normal, resulta no aumento da atividade da atividade kinase JH1. A mutação V617F no domínio regulador JH2 liberta o domínio JH1 da inibição, levando a uma ativação constitutiva mesmo na ausência de ligação das citocinas. Além das funções apresentadas, o que chama atenção de pesquisadores atualmente é a atuação dessa proteína na via de sinalização JAK-STAT, que transmite sinais químicos a partir de citocinas para o núcleo da célula e sua possível relação com o desenvolvimento das síndromes mieloproliferativas (PERCY, 2005).

2.3 Características das citocinas, receptores e estrutura enzima JAK e STAT

As citocinas desempenham atividades fisiológicas importantes como: a ativação da resposta imune celular e humoral, regulação da hematopoiese e controle da proliferação e diferenciação celular. Seus efeitos ocorrem quando se liga ao seu receptor específico expresso na superfície da célula-alvo, o que desencadeia a transdução de sinais no interior da célula (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2005).

Em geral os receptores de citocinas tem domínio de homologia SH2 característico dentro do qual estão localizados resíduos de tirosina que funcionam como alvos para as JAK. Quando os domínios de ligação SH2 são fosforilados transformam-se em locais de ancoramento para proteínas que se ligam ao receptor pelas vias de sinalização. Entre os receptores mais comuns na via de sinalização JAK-STAT pode-se destacar o CD130 receptor para IL 6 e IL11, CD132 receptor para IL2, IL4, IL7, IL9, e IL5, CD122 receptor para TNF α IL1, CDw131 receptor para IL3, IL5 (KISSELEVA, T. et al. 2011).

A Família de receptores de cadeia única é composta por: EPO-R (eritropoietina) e TPO (trombopoietina). Os dois compartilham duas características importantes como: uma cadeia que homodimeriza mediante a ligação de ligandos e sinalizam através da ativação sequencial de JAK2 e STAT5. O receptor EPO-R será descrito ao longo da pesquisa, já que estudos com ratos knockout JAK2 exibiram um fenótipo letal embrionário, morrendo no dia 12,5 de gestação. A morte foi atribuída a uma falha em definitivo da eritropoiese, estes estudos estabeleceram que JAK2 apresenta atividade essencial com a Epo, seu receptor e posterior sinalização (WU et al, 1995; NEUBAUER et al, 1998; PARGANAS et al, 1998).

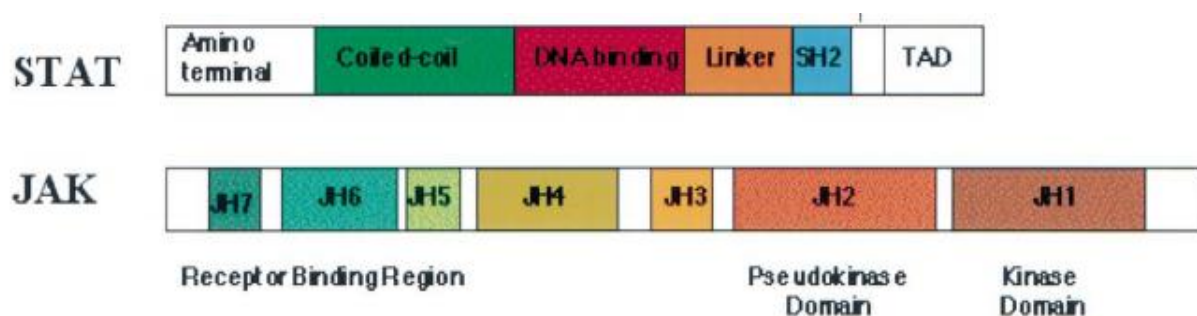
Os receptores de citocinas em sua maioria são compostos por subunidades

distintas: uma cadeia α envolvida na ligação da citocina e na transdução de sinais e outra cadeia β envolvida na cascata de sinalização. A cadeia α é associada a uma família de proteínas tirosinas kinases chamada família JAK (LINDAUER, 2001; CACALANO, 2001; STARK, 1998; KITTUR, 2007; WESTENBRINK, 2007).

Estudos genéticos demonstram que as JAKs e as STATs possuem funções altamente específicas no controle de várias respostas (ou reações) imunes. As enzimas JAKs, produzidas a partir do gene JAK, estão presentes no citoplasma das células especificamente associadas a receptores de membrana que realizam ligação com citocinas no meio extracelular (IHLE et al., 2007).

A família JAK possui 4 membros: JAK1, JAK2, JAK3 e tirosina kinase 2 (TYK2). A pseudo-kinase dominante regula a atividade da kinase das JAKs. As STATs possuem 7 componentes: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B e STAT6, os quais são altamente homólogos em várias regiões, incluindo a SRC homology 2 (SH2) dominante envolvido na ativação e dimerização das STATs. Na figura 3 pode-se observar a estrutura do domínio das JAKs a estrutura de domínio das proteínas STATs (SHUALI, 2003).

Figura 3 – Estrutura dos domínios da JAK e STATs



FONTE: Kisseleva e colaboradores (2002).

A comparação das sequências JAK revela sete regiões alta homologia, JH1-JH7. Mesmo que a atividade biológica de cada uma dessas regiões não tenha sido totalmente compreendida, vários domínios estão bem caracterizados. JH1 mostra-se a codificar a kinase, JH2 representa um domínio pseudo-kinase, o qual é requerido para a atividade catalítica do JH1. O domínio homólogo amino terminal JH3 - JH7, tem sido implicado na associação do receptor (YEH, et al., 2000).

O domínio kinase conservado encontrado no JH1, exibe componentes clássicos da tirosina kinase, incluindo tirosinas conservadas como: Y1038/Y1039 no

JAK1, Y1007/Y1008 no JAK2, Y980/Y981 no JAK3, Y1054/ Y1055 na Tyk2. A fosforilação das duas tirosinas leva a mudanças conformacionais as quais facilitam a ligação do substrato. Então os domínios JH1-JH7 são baseados na similaridade de sequência de quatro JAKS conhecido (LEONARD, 1998).

Estudos sugerem que o domínio N-terminal STAT promove a interação com o coativador de transcrição, domínios de receptores e regulação da translocação nuclear. Recentes pesquisas indicam que a dimerização do domínio N-terminal promove cooperatividade da ligação com as regiões GAS. Coiled-coil domain (domínio enrolado em espiral), é uma cadeia flexível de polipeptídeo próxima ao domínio N-terminal. Alguns pesquisadores descrevem o domínio como uma “corda” enrolada no receptor, auxiliando na fosforilação da tirosina e exportação nuclear (LEUNG et al, 1996;. MURPHY et al, 2000).

O ADN (DNA-binding domain), componente dos domínios STATs reconhecem bases na metade mais proximal GAS, ficando com um número considerável de locais em contato direto com o DNA, o que mostra sua atividade e função bastante relacionadas com atividade de transcrição eficaz, mas segundo McBride et al. (2000), o domínio de ligação de ADN apresenta uma conformação diferente, o que é atraente para considerar a possibilidade de que ele possa ter outras funções adicionais. Linker é o domínio que liga o domínio de ADN com o domínio SH2, mas algumas pesquisas implicam linker como domínio de regulação da transcrição em STAT1 (HORVATH, 2000; SHUAI, 2000).

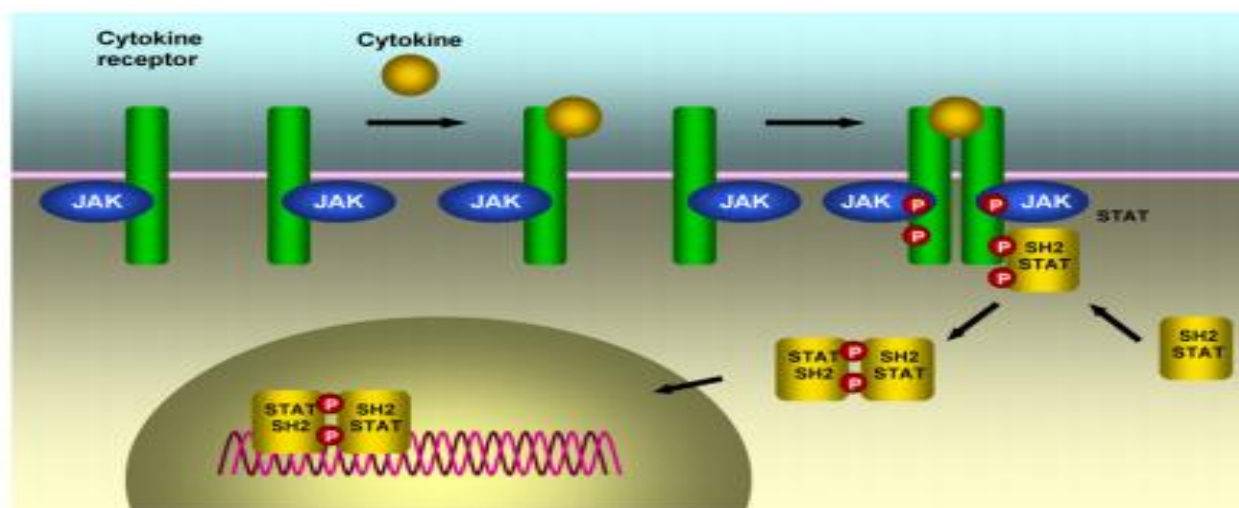
2.4 Via de sinalização JAK-STAT

A via de sinalização JAK/STAT é uma das várias cascatas pleotrópicas usadas para traduzir múltiplos sinais de desenvolvimento em animais, desde humanos a insetos. A ativação da proteína JAK estimula a proliferação celular, diferenciação, migração celular e apoptose. Estes eventos celulares são críticos para a hematopoiese, desenvolvimento imunitário, crescimento sexual dimórfico, entre outros processos. Previsivelmente, mutações que reduzem a atividade da via JAK/STAT afetam esses processos. Por outro lado, mutações que constitutivamente ativam ou levam a uma falha na regulação desta via, causam doenças inflamatórias, gigantismo, e vários tipos de leucemias. (RAWLINGS, 2004).

Quando a citocina se liga ao receptor induz à associação (dimerização) das

cadeias α e β ocorrendo uma conformidade do receptor e a ativação das JAKs pela transforilação (quando são trazidas para mais próximo uma das outras). Os próprios receptores de citocinas funcionam como substrato para as JAKs. A ativação das JAKs leva a fosforilação de resíduos de tirosina o que gera sítios para a ligação dos fatores de transcrição STAT (signal transducers and activators of transcription). Depois da fosforilação de um resíduo específico de tirosina realizada pelas JAKs, a proteína STAT é dissociada das subunidades do receptor, caminha para o núcleo da célula, então seus dímeros ligam-se as regiões promotoras dos genes e ativam a transcrição (VAINCHENKER, 2011; MULLALLY, 2010).

Figura 4 – Via de sinalização JAK-STAT



FONTE: Adaptado de Mohr e colaboradores (2012).

Esse mecanismo intracelular ocorre normalmente quando as enzimas JAKs não sofrem nenhum tipo de dano (mutação), são codificadas sem nenhuma alteração e exercem sua função de transdução de sinal normalmente. Porém, quando a mutação ocorre gerando a JAK2 V617f a função de controle da produção de células hematopoiéticas é afetada e a enzima passa a ter uma atividade independente dos ligantes de sinalização, fazendo com que a produção de algumas linhagens hematológicas de células seja exacerbada. O que torna a mutação estritamente importante para as síndromes mieloproliferativas, visto que seu poder de proliferação independente interfere no prognóstico de pacientes (UNGUREANU, 2002; LINDAUER et al., 2001; ZHAO et al., 2005; ROSS et al., 2007).

2.5 Relação mutação JAK2 V671F com receptor EPOR

A eritropoietina é um hormônio glicoproteico que regula a proliferação e a diferenciação das células progenitoras hematopoiéticas na medula óssea, estimulando a diferenciação e a proliferação das células eritróides ao interagir com receptores específicos de eritropoietina, existentes em diferentes tipos celulares. Sua liberação é regulada por mecanismos de retroalimentação associados com os níveis de oxigênio no tecido renal (GARCIA et al., 2005).

Esse hormônio glicoproteico atua sobre a eritropoiese de modo complexo através: a) da estimulação na proliferação de células indiferenciadas medulares, produzindo maior número de mitoses dessas células; b) da estimulação do amadurecimento das células indiferenciadas de onde surgem os primeiros eritroblastos, denominados proeritroblastos; c) da estimulação na síntese da hemoglobina; d) do aumento na taxa de reticulócitos no sangue (LORENZI, 2003).

Existem receptores para a EPO nas mais variadas células, como o cérebro (astrócitos, neurônios), trato gastrointestinal, células endoteliais, pericárdio, células pancreáticas, placenta, em tecidos tumorais, trato genital feminino, órgãos reprodutivos masculinos, glândulas mamárias, macrófagos da medula óssea e progenitores eritróides (FELDMAN, 2003; MELANIE, 2005).

No cérebro e Sistema Nervoso Central, a EPO promove neurogênese. É um fator anti-apoptótico e promove proteção contra danos causados por hipóxia. Ela ativa a produção de enzimas anti-oxidativas, metaboliza radicais livres e afeta a liberação de neurotransmissores. Já no trato gastrointestinal a glicoproteína tem um efeito trófico sobre os enterócitos, promove crescimento e maturação celular (LOHMEYER et al., 2008).

No sistema reprodutivo feminino sua expressão é dependente do estrógeno. A EPO está envolvida na angiogênese e em mudanças cíclicas celulares. Também está envolvida na sobrevivência, proliferação e diferenciação celular. Nas células endoteliais sua principal função é a de angiogênese e nos demais órgãos (rim, músculos, sistema reprodutivo masculino) é responsável pela sobrevivência e proliferação celular. Também atua na formação indireta de megacariócitos, progenitores monocíticos e granulocíticos (FELDMAN, 2003; NATALI, 1996).

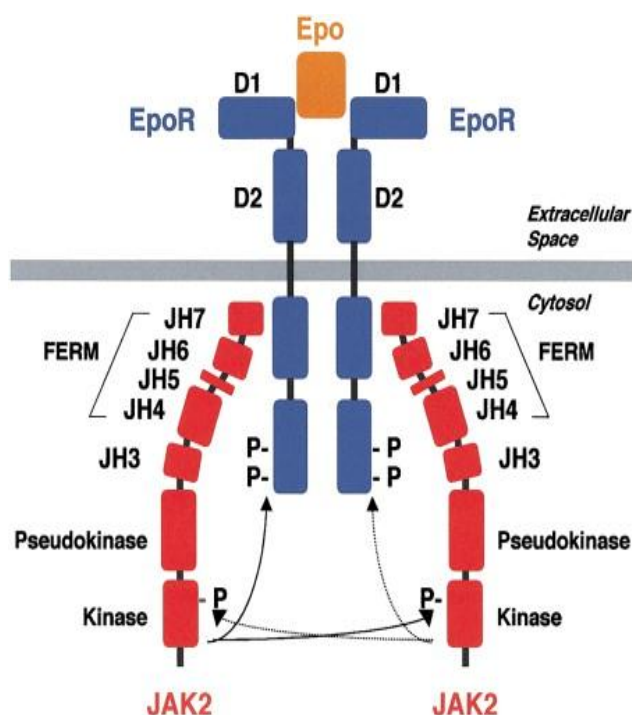
O receptor EPOR pode ser dividido em duas regiões principais, basicamente, a parte que fica próxima à membrana plasmática é requerida para a geração de sinais,

proliferação e diferenciação, tal como a indução da síntese de globina. A outra metade restante não é requerida para esta sinalização, mas ela age para amortecer os sinais. Sabe-se que uma tirosina kinase chamada JAK2 associa-se com a região próxima da membrana plasmática, sofre autofosforilação e fosforila o receptor EPO e um fator de transcrição chamado STAT (HAIYING ZOU, 2011; KISSELEVA, 2002).

A mieloproliferação anormal surge da ativação constitucional de vias de transdução de sinais, causadas por rearranjos genéticos ou mutações que afetam as proteínas tirosina kinases ou moléculas relacionadas. Em pacientes com SMP, que possuem a mutação JAK2V617F, a via de transdução de sinal JAK/STAT está constitucionalmente ativada, na ausência da ligação da EPO ou da TPO aos seus receptores (MCBRIDE, 2000; ROGERS, 2006).

A Figura 5 ilustra o receptor EPOR sua estrutura externa com seus 2 domínios respectivos que se ligam ao hormônio específico a eritropoietina sofrendo uma conformação, os 2 domínios internos sofrem acoplamento de duas enzimas JAKs que ficam ancoradas pelo domínio FERM os domínios pseudo kinases e kinase são responsáveis pela fosforilação das enzimas que liberam substratos de tirosinas (IHLE, 2001).

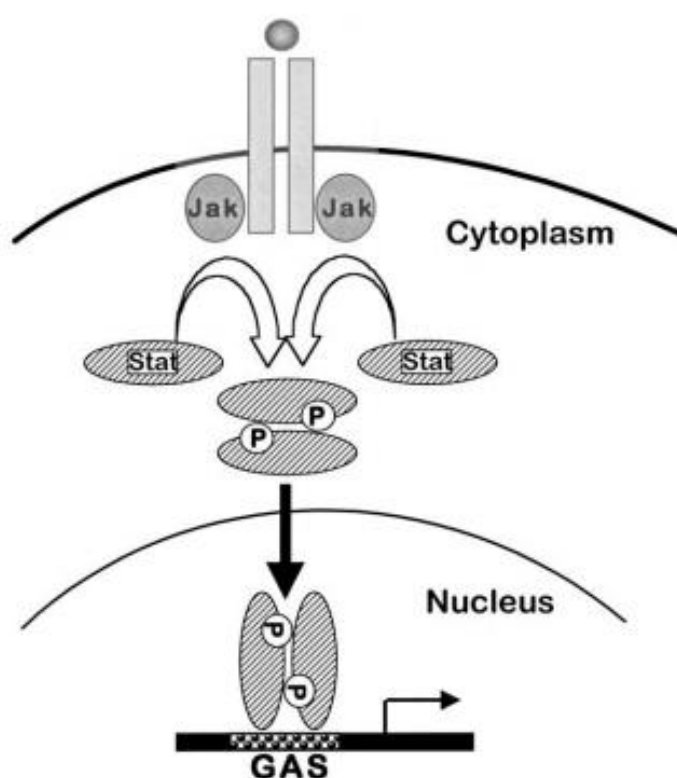
Figura 5 – Estrutura receptor EPOR e o acoplamento das enzimas JAKs



FONTE: Adaptado de Bonifacin (2002).

A Figura 6 mostra, além da estrutura do receptor e sua ligação com a citocina, o acoplamento das JAKs, que após a fosforilação recrutam as proteínas STATs que são fosforiladas e se soltam, se homodimerizam pelo domínio SH2, formando uma estrutura que se transloca para o núcleo e se liga a membros da GAS (Gamma Activado Site), família de promotores onde posteriormente ocorreram processos de transcrição (ARORA, 2003; SOMMERAUER, 2012).

Figura 6 – Via de sinalização JAK-STAT ligação da proteína STAT até o núcleo



FONTE: Adaptado de Kisseleva e colaboradores (2002).

2.6 Mecanismo de regulação JAK

2.6.1 Proteína SOCS

A família das proteínas SOCS possui oito membros: CIS (proteína citokine-induzida SH2 dominante) e SOCS1 ao SOCS7. Contém um domínio SH2, o qual é flanqueado por uma variável amino-terminal dominante e uma parte carboxy-terminal. As funções dos SOCS1, SOCS2, SOCS3 e CIS têm sido bem estudadas

visto que as proteínas SOCS inibem a sinalização das citocinas, inibindo sinalização JAK-STAT. Como por exemplo, o domínio SH2 da SOCS1 que se liga diretamente à tirosina fosforilada JAK, resultando na inibição da atividade do JAK interrompendo a via de sinalização JAK-STAT (ILANGUMARAN, et al., 2004).

Esta proteína, chamada SOCS-3 (supressor of cytokine signaling-3), foi inicialmente descrita como sendo induzida por uma série de estímulos gerados por citocinas, tendo a função de controlar o sinal pró-inflamatório. As SOCS podem ter sua expressão estimulada pela leptina, e uma vez presente no citosol, podem interagir com JAK-2 e STAT-3 e assim regular negativamente a sustentação do sinal gerado pela leptina. Tal suposição foi comprovada por estudos que mostram que a proteína SOCS-3, induzida pelo estímulo por leptina, liga-se à JAK-2 e inibe por até 20 horas (LÍCIO, 2006).

Mas a inibição das JAKs pela SOCS3 requer a ligação da SOCS3 ao receptor ativado que faz ligação com a citocina sofrendo conformação e estimulando as JAKs. A CIS em vez de agir nos JAKs, atua inibindo a ativação do STAT pelo fato de competir com os STATs pela ligação lugares de hospedagem do receptor. Uma propriedade importante das proteínas SOCS é que elas afetam especificamente a cinética da sinalização JAK-STAT, porém não possuem efeito no processo de ativação inicial (CACALANO, 2001; HAAN, et al., 2003).

2.6.2 Outros mecanismos de regulação via JAK-STAT

Além dos dois mecanismos de regulação já citados, outras atividades de regulação são relevantes para o controle da via JAK-STAT como, por exemplo, a ubiquitinação, mecanismo pelo qual tem como característica de funcionamento a adição de marcadores moleculares como as ubiquitinas à superfície do alvo a ser degradado acarretando em sua destruição como proteossomas (complexo 26S que contem várias enzimas proteolíticas e que reorganiza e degrada especificamente proteínas marcadas) (ULRICH, 2002).

A adição desses marcadores moleculares ocorre por meio de várias etapas até chegar na fase em que as enzimas, chamadas ligases de ubiquitina, são adicionadas por uma ligação tiol-éster às cadeias laterais da proteína alvo, essa ligação proporcionada a degradação da proteína alvo (UNGUREANU et al., 2002).

Após a estimulação citocina-receptor, as STATs passam a ser tirosinas

fosforiladas num único resíduo conservado. A fosforilação da tirosina das STATs é requerida para a sua dimerização, translocação nuclear e ligação DNA. Portanto, a fosforilação da tirosina funciona como uma troca de sinal para ativar STATs (SCHINDLER et al., 1992; SHUAI et al., 1992; MEYER et al., 2005; MCBRIDE et al., 2000).

Todos os mecanismos de regulação citados fazem parte do conjunto de interações que ocorrem no meio intracelular, sendo de grande importância para a manutenção da via JAK-STAT e fazem com que a célula se mantenha viável, ou seja, em condições de continuar exercendo suas funções de transcrição e tradução. Isso faz com que a célula fique livre da apoptose, isso geralmente acontece quando a célula passa a ter uma atividade própria, não respondendo mais aos mecanismos de regulação e estímulos de citocinas em seus receptores (GAZ, 2001; PERCY, 2005; OKUGAWA, 2011).

2.7 Enquadramento da mutação JAK2 V671F como critério de diagnóstico das principais doenças neoplásicas mieloproliferativas Ph-

A Policitemia Vera (PV) é doença neoplásica clonal caracterizada pelo aumento do volume total da massa eritrocitária independente da ação dos mecanismos habituais de regulação da eritropoese. Segundo a OMS, para o diagnóstico de PV há a necessidade do preenchimento de dois critérios maiores e um critério menor ou a presença simultânea de um maior e dois menores (LORENZI, 2006).

Quadro 1 – Critérios maiores e menores para diagnóstico de pacientes com PV, segundo classificação da Organização Mundial da Saúde (2010)

Critérios Maiores	Critérios Menores
Hemoglobina >18,5g/dL para homens, >16,5g/dL para mulheres ou outras evidências de aumento de massa eritrocitária	BMO* demonstrando hipercelularidade para a idade com panmielose (proliferação proeminente das séries eritroide, granulocítica e megacariocítica)
Presença da mutação JAK2 V617F ou outra funcionalmente similar (ex., éxon 12)	Eritropoetina sérica abaixo do valor de normalidade
	Formação <i>in vitro</i> de colônia eritroide endógena

Onde: *Biopsia de medula óssea.

FONTE: OMS (2010).

Pesquisas recentes evidenciam que a mutação V617F no gene JAK2 está presente em cerca de 90% dos pacientes com PV, sendo um valor considerável para o desenvolvimento de pesquisas envolvendo esclarecimentos maiores quanto à relação entre a expressão da mutação e a progressão da doença (MONTE-MÓR et al., 2008).

A Trombocitemia Essencial apresenta um aumento de plaquetas, por excessiva proliferação megariocítica e tem como característica central do diagnóstico uma contagem de plaquetas maior que 450×10^9 . A metade dos pacientes apresenta mutação do JAK2 (Val617Phe), como a série eritróide normal. O cromossomo Philadelphia (Ph) e o rearranjo BCR-ABL estão ausentes. De acordo com os critérios de classificação da OMS é necessário o preenchimento dos quatro critérios para o diagnóstico da TE (BASQUERA, 2010).

Quadro 2 – Critérios de diagnóstico de pacientes com TE, segundo classificação da Organização Mundial da Saúde (2010)

Critérios de Diagnóstico para TE	
1	Plaquetometria $>450.000/\mu\text{L}$
2	Presença da mutação JAK V617F ou outras
3	Ausência de critérios da OMS* para PV, MF, LMC BCR/ABL1+, síndrome mielodisplásica [ausência de del(5q), t(3;3)(q21;q26), inv(3)(q21;q26)] ou outra neoplasia mieloide
4	BMO** mostrando proliferação principalmente da linhagem megacariocítica com megacariócitos maduros aumentados em número e tamanho. Ausência de aumento significativo ou desvio à esquerda granulopoese neutrofílica ou eritropoese

Onde: *Organização Mundial da saúde; **Biopsia de medula óssea.

Fonte: OMS (2010).

A MF é um distúrbio clonal das células que tem como principal característica a fibrose generalizada e progressiva na medula óssea e compõem o grupo de doenças pertencentes à síndrome mieloproliferativa. Com relação à confirmação diagnóstica da MF é necessário o encontro de pelo menos três critérios maiores e dois menores para a confirmação diagnóstica de MF (LIPKA, 2008).

Quadro 3 – Critérios maiores e menores para diagnóstico de pacientes com MF

Critérios Maiores	Critérios Menores
Presença de proliferação megacariocítica e atipia, geralmente acompanhada de fibrose reticulínica ou colagênica ou, na ausência de fibrose significativa, as alterações megacariocíticas devem se acompanhar de aumentada celularidade da medula à custa de proliferação granulocítica com diminuição da eritropoese (fase préfibrótica)	Leucoeritroblastose
Presença da mutação JAK2 V617F ou outro marcador clonal (MPLW515K/L) ou, na ausência de marcador clonal, nenhuma evidência de que a fibrose medular ou demais alterações sejam secundárias a infecção, inflamação, tricocitoleucemia, neoplasia linfóide, metástase ou mielopatias tóxicas.	Aumento de DHL sérico
Ausência de critérios da OMS para PV, LMC BCR/ABL1+, síndrome mielodisplásica ou outra neoplasia	Anemia
	Esplenomegalia

FONTE: OMS (2010).

A mutação JAK2 está presente em cerca de 50% dos pacientes que tem diagnóstico confirmado para a doença hoje sua pesquisa já está dentro do quadro de critérios maiores para o diagnóstico. Em várias pesquisas percebe-se a frequência da distribuição do JAK2 V617F expondo sua grande influência em pacientes com SMP, confirmando resultados elevados como: PV (89%), ET (69%), e MI (47%) em um total de cento e três pacientes envolvidos no presente estudo citado (HOFFBRAND et al., 2008).

Desde a sua descoberta a mutação JAK2 V617F vendo sendo estudada, pois acredita-se que ela é a característica genética molecular chave para pacientes que tem diagnóstico confirmado de SMP, sendo o foco de pesquisas atuais que buscam aplicação de novas metodologias que possam tornar mais simples a detecção da mutação JAK2 V617F, classificação, tratamento e prognóstico dos pacientes com SMP (FU, 2007).

3 Considerações Finais

A genética, assim como biologia molecular, e o conhecimento da imunologia evoluem rapidamente a cada dia, trazendo consigo um olhar inovador sob o desconhecido, abrindo caminho para chegarmos à chave de respostas ainda não encontradas, mostrando que pequenos detalhes podem fazer toda a diferença no

desenvolvimento e evolução do quadro clínico de pacientes que portam pequenas, mas importantes “mutações”. Elas mostram seu grande poder ativo sob as mais variadas espécies. A mutação JAK2 V617F evidencia como o mistério de uma única alteração pode mudar todo um sistema celular, interferindo no controle vital e desencadeando uma sequência que não pode mais ser revertida. Hoje a mutação JAKV617F é uma das mais novas mutações estudadas no mundo, passando a ser incorporada aos critérios de diagnóstico das SMPs Ph- e auxiliando, portanto, no diagnóstico e possível tratamento dos pacientes portadores. Este é apenas o início de um futuro promissor que busca a cada dia desvendar novas respostas.

Mechanism of JAK2 V617F mutation and its relevance as diagnosis criteria of main Ph- myeloproliferative neoplasms.

Abstract

Myeloproliferative syndrome is a clonal hematopoietic disease that shows amplification of one or more myeloid lineage, It is represented by group of three diseases: Polycythemia Vera, Essential thrombocythemia, Myelofibrosis, which share clinical and biological common aspects. When we relate pathophysiology of some myeloid neoplasms involved, we detect a presence of altered tyrosine kinases and hyperactive fused proteins that come from translocations which do an important role for genetical basis of researchs related with myeloproliferative syndrome. The JAK2 protein, from Janus Kinases family, is a phosphorylated tyrosine kinase too in response to actions of many cytokines, It activates different intracellular signalling pathway and It joins in the signal transduction process. It is a local mutation: The substitution of a guanine for thymine (G T) in exon 14 of JAK2 gen, it leads to substitution of valine for phenylalanine (V F) in 617 position of coded protein (JAK2 V617F). This changing is somatic, being detected in cells of myeloid lineage. JAK2 V617F mutation is detected in about 95% of patients with Polycythemia Vera, 50% in patients with Essential thrombocythemia and 60% in patients with myelofibrosis. It shows that JAK2 V617F mutation is the genetic molecular important characteristic to individuals that have confirmed diagnoses of SMP.

Keywords: Myeloproliferative syndrome, JAK2 V617F mutation, signalling pathway, diagnoses

Referências

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. São Paulo: Elsevier, 2005. Cap.12, p. 270-273
- AOYAMA, H. et al. Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. **Quim. Nova.**, Campinas, 26:896-900, 2003.
- ARORA, T. et al. PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4. **J. Biol. Chem.**, Los Angeles, 24:21327-21330, 2003.
- BAQUEIRA, A. L.; SORIA, N. W.; RYSER, R. Clinical significance of V617F mutation of the JAK2 gene in patients with chronic myeloproliferative. **Rev. Hematology.**, Córdoba, 14:323-330, 2009.
- BITTENCOURT, R. et al. Trombocitose essencial: o que é essencial saber. **RBHH**, São Paulo, 32:162-170, 2010.
- BONIFACIN, J. S. Quality control of receptor-kinase signaling complexes. **Science Direct**, 2:1-7, 2002.
- CACALANO, N. A.; SANDEN, D.; JOHNSTON, J. A. Tyrosinephosphorylated SOCS-3 inhibits STAT activation but binds to p120 RasGAP and activates Ras. **Nature Cell.**, California, 4:460-465, 2001.
- CASCIATO, A. D. **Manual de Oncologia Clínica**. São Paulo, 2008. Cap 3, p.750-754
- D'ANDREA, A. D.; LODISH, H. F.; WONG, G. G. Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. **Cell.**, Massachusetts, 57:277-285, 1989.
- FELDMAN, L.; SYTKOWSKI, A. Pleiotropic actions of erythropoietin. In: **Environmental Health and Prev. Med.**, New York, v.7 2003.
- FRANCOIS, O.; DURAND, E. Spatially explicit Bayesian clustering models in population genetics. **Molecular Ecology Resources.**, New York, 10:773-784 2010.
- FU, X. Y.; ZHANG, J. J. Transcription factor p91 interacts with the epidermal growth factor receptor and mediates activation of the c-fos gene promoter. **Cell.**, New York, 74:1135-1145, 1993.
- GARCIA, J. M. J. et al. Erythropoietin pharmacology. In: **Clinical and Translational Oncology.**, São Paulo, v.7, 2007.
- HAAN, S. et al. Tyrosine phosphorylation disrupts elongin interaction and accelerates SOCS3 degradation. **J. Biol. Chem.**, 278:31972–31979, 2003.
- HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H.; PITTIT, E. J. **Fundamentos da Hematologia**. Porto Alegre, 2004. Cap 19, p.240-245

HORVATH, C. M. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. **Trends Biochem. Sci.**, Stony Brook, 25:496-502, 2000.

HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. **Cell.**, California, 27:225-236, 1995.

IGAZ, P.; TOTH, S.; FALUS, A. Biological and clinical significance of the JAK–STAT pathway; lessons from knockout mice. **Inflamm. Res.**, Budapest, 50:435-441, 2001.

IHLE, J. N. The Stat family in cytokine signaling. **Cell Biol.**, New York, 13:211-217, 2001.

IHLE, J. N.; GILLILAND, D. G. Jak2: normal function and role in hematopoietic disorders. **Curr. Opin Genet. Dev.**, New York 17:8-14, 2007.

ILANGUMARAN, S.; RAMANATHAN, S.; ROTTAPPEL, R. Regulation of the immune system by SOCS family adaptor proteins. **Semin Immunol.**, New York, 16:351-365, 2004.

KEERSMAECKER, K.; COOLS, J. Chronic myeloproliferative disorders: a tyrosine kinase tale. **Leukemia.**, Leuven, 20:200-205, 2006.

KISSELEVA, T. et al. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. **Gene.**, New York, 2:1-24, 2002.

KITTUR, J. et al. Clinical correlates of JAK2V617F allele burden in essential thrombocythemia. **Cancer.**, New York, 109: 2279-2284, 2007.

KRALOVICS, R. et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. **N. Engl. J. Med.**, Basel, 352:1779-1790, 2005.

LEONARD, W.; O'SHEA, J. J. JAKS and STATS: Biological implications. **Rev. Immunol.**, New York, 16:293–322, 1998.

LEVINE, R. L. et al. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. **Mol. Cell. Biol.**, Florida, 20:3387–3395, 2000.

LINDAUER, K. et al. Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising the two carboxyterminal domains reveals a mechanism for autoregulation. **Protein Eng.**, New York, 14:27–37, 2001.

LIPKA, D. B.; HOFFMANN, L. S.; HEIDEL, F. LS104, A non-ATP-competitive small-molecule inhibitor of JAK2, is potently inducing apoptosis in JAKV617F-positive cells. **Mol. Cancer. Ther.**, Mainz, 7:1176-1184, 2008.

LIU, B. et al. A transcriptional co-repressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, California, 98:3203-3207, 2001.

LOHMEYER, J. A. et al. Use of Erythropoietin as adjuvant therapy in nerve reconstruction. **Langenbecks Archives of Surgery.**, New York, 393:317-323, 2008.

LORENZI, T. F. **Manual de Hematologia:** propedêutica e clínica. Rio de Janeiro: Medsi, 2003. Cap 4, p.303-310

LUCIA, E. et al. The incidence of JACK2 V617F mutation in bcl-abl negative chronic myeloproliferative disorders: assessment by different detection methods. **Leuk Lymphoma.**, Cosenza, 10:1907-1915, 2008.

MCBRIDE, K. M.; MCDONALD, C.; REICH, N. C. Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor. **Embo J.**, New York, 19:6196–6206, 2000.

MELANIE, J. P.; MCMULLIN, M. F. PerspectiveThe V617F JAK2 mutation and the myeloproliferative disorders. **Hematol. Oncol.**, 23:91-93, 2005.

MEYER, T. et al. DNA binding controls inactivation and nuclear accumulation of the transcription factor Stat1. **Genes Dev.**, Berlin, 17:147-153, 2005.

MONTE-MÓR, B. C. R.; COSTA, F. F. A mutação JAK2 V617F e as síndromes mieloproliferativas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, Campinas, 3:241-248, 2008.

MULLALLY, A. et al. Physiological Jak2V617F expression causes a lethal myeloproliferative neoplasm with differential effects on hematopoietic stem and progenitor cells. **Cancer Cell.**, New York, 17:584-596, 2010.

MURPHY, T. L. et al. Role of the Stat4 N domain in receptor proximal tyrosine phosphorylation. **Mol. Cell. Biol.**, Missouri, 20:7121–7131, 2000.

NATALI, A. J.; RASSIER, D. J. E.; DE ROSE, E. H. Eritropoietina e exercício físico. **Movimento**, Campinas, 4, 1996.

NEUBAUER, H. et al. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. **Cell.**, 93:397-409, 1998.

OKUGAWA, S. et al. The SOCS and STAT from JAK/STAT signaling pathway of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*: Molecular cloning, characterization and expression analysis. **Molecular and Cellular Probes.**, 17:35-53, 2012.

PARGANAS, E. et al. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. **Cell.**, Tennessee, 93:385-395, 1998.

PERCY, M.; MCMULLIN, M. The V617F mutation and the myeloproliferative disorders. **Hematological Oncology**, 23:3-10, 2005.

PETITT, R. M.; SILVERSTEIN, M. N.; PETRONE, M. E. Anagrelide for control of thrombocythemia in polycythemia and other myeloproliferative disorders. **Semin. Hematol.**, New York, 34:51-62, 1997.

RANDI, M. L.; PUTTI, M. C. Essential thrombocythemia in children: is a treatment needed? **Expert Opin Pharmacother.**, Washington, 5:1009-1014, 2004.

RAWLINGS, S.; ROSLER, K.; HARRISON, D. The JAK/STAT signaling pathway. **J. of Cell Science.**, New York, 117:4-20, 2004.

ROGERS, R. S.; HORVATH, C. M.; MATUNIS, M. J. SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation. **J. Biol. Chem.**, Maryland, 278:30091-30097, 2003.

SCHINDLER, C. et al. Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. **Science.**, New York, 257:809-813, 1997.

SHUAI, K. et al. Activation of transcription by IFN- γ : tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. **Science.**, New York, 258:1808-1812, 1992.

SHUAI, K. Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. **Oncogene.**, California, 19, 2638–2644, 2000.

SOMMERAUER, M. V.; MÜLLER-NEWEN, G. Review Dynamics and non-canonical aspects of JAK/STAT signalling. **European Journal of Cell Biology.**, 91:524-532, 2012.

SPIVAK, L. Narrative review: Thrombocytosis, Polycythemia Vera and JAK2 Mutations: The phenotypic mimicry of chronic myeloproliferation. **Ann. Intern. Med.**, New York, 152:300-306, Mar. 2010.

STARK, G. R. et al. How cells respond to interferons. **Rev. Biochem.**, Ohio, 67:227-264, 1998.

ULRICH, H. D. Degradation or Maintenance: Actions of the Ubiquitin System on Eukaryotic Chromatin. **Eukaryotic Cell.**, New York, 1:1-10, 2002.

UNGUREANU, D. et al. Regulation of Jak2 through the ubiquitin–proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1. **Mol. Cell. Biol.**, Tampere, 22:3316-3326, 2002.

VAINCENKER, W. et al. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. **Blood.**, Washigton, 118:1723-1735, 2011.

VAN DIJKEN, P. J. Essential thrombocythemia in a 5-month-old infant: **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, Tennessee, 4:35-45, 1997.

VELLOSO, L. A. O controle hipotalâmico da fome e da termogênese – Implicações no desenvolvimento da obesidade. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, 50:40-48, 2006.

WESTENBRINK, B. D. et al. Therapeutic Potential of Erythropoietin in Cardiovascular Disease: Erythropoiesis and Beyond. **Current Heart Failure Reports.**, 4:127-133, 2007.

YEH, T. C et al. A dual role for the kinase-like domain of the tyrosine kinase Tyk2 in interferon-alpha signaling. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, New York, 97:8991-8996, 2000.

ZHAO, R. et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. **J. Biol. Chem.**, Tennessee, 280:22788-22792, 2005.

ZOU, H.; YAN, D.; GOLAM, M. Differential biological activity of disease-associated JAK2 mutants. **FEBS Lett.**, 585:1007-1013, Abr. 2011.